

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭64-55181

⑬ Int. Cl.⁴C 12 N 15/00
C 07 K 7/08
7/10

識別記号

庁内整理番号

A-8412-4B
8318-4H
8318-4H※

⑭ 公開 昭和64年(1989)3月2日

審査請求 未請求 請求項の数 81 (全23頁)

⑮ 発明の名称 特定のアミノ酸組成を有する人工タンパク質、並びにその調製法

⑯ 特 願 昭63-26419

⑰ 出 願 昭63(1988)2月6日

優先権主張 ⑱ 1987年2月6日 ⑲ 欧州特許機構(E P) ⑳ 87101633.3

㉑ 発 明 者 フベルト・ケステル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ01742、コンコルド、
モニユメント・ストリート 1640番㉒ 出 願 人 ビオシンテック・ビオ
ケミシエ・シンテセテ
クニツク・ゲゼルシャ
フト・ミット・ベシユ
レンクテル・ハフツン
グドイツ連邦共和国デー - 2000 ハンブルグ50、ストレーセマン
ストラーセ268 - 280番㉓ 代 理 人 弁理士 青 山 篠 外1名
最終頁に続く

明 細 書

セ ッ ト H :

1. 発明の名称

特定のアミノ酸組成を有する人工タンパク質、
並びにその調製法

2. 特許請求の範囲

1. 特定のアミノ酸組成の人工タンパク質をコ
ードしている合成DNAカセット。

2. 以下のヌクレオチド配列からなるDNAカ

セットA:

GGCCATGGTTTCTGGTACCTGGTTATCAAGTTATCGGTCCTGCTGACCCACAACACAC
CCGGTACCAAAAGACCATGGACCAATAGTTTCAATAGCCAGACCCAGACTGGGTGTTTGTGTGCCTGATCACCTGAAGCTTGG
GGACTAGTGGACTTGAACC

3. 以下のヌクレオチド配列からなるDNAカ

セットB:

CCCTGATCACCCGGGTTCCGGGCTTCCGACAGCAGCCAGGTCCGCCGGGTGCTGAGGCAG
GGGACTAGTGGGCCCAAGGCCGCCGAGGGCGTCTGCTGCTCCAGGCCGCCACGACTCCGTCCTGAGGCTGCAGGTGCATGCTGAAGCTTGG
GACTCCGAGCTCCACGTACGACTTCCGAACC

4. 以下のヌクレオチド配列からなるDNAカ

5. 成分と成分とを連結させるオリゴマー化の
程度が2-12であるオリゴマー化によって特徴
付けられる請求項1から請求項4までのいずれか
に記載のDNAカセット。6. カセット当たり最高4個の暗号文字が減っ
ている突然変異形態である請求項1から請求項5
までのいずれかに記載のDNAカセット。7. 請求項1、2、3、4、5及び/又は6に
記載のDNAカセットA、B及びHの組合わせ物。8. オリゴマー化及び/又は突然変異している
請求項2、請求項5又は請求項6のいずれかに記
載のDNAカセットAを含有することを特徴とす
る発現ベクター。9. オリゴマー化及び/又は突然変異している
請求項3、請求項5又は請求項6のいずれかに記

載のDNAカセットBを含有することを特徴とする発現ベクター。

10. オリゴマー化及び／又は突然変異している請求項4、請求項5又は請求項6のいずれかに記載のDNAカセットHを含有することを特徴とする発現ベクター。

11. 請求項7に記載のDNAカセットの組合
わせ物を含有することを特徴とする発現ベクター。

12. 突然変異カセットA:

 AF^-, AW^-, AY^-, AM^-

のいずれかを含有することを特徴とする請求項 8
に記載の発現ベクター。

13. 以下のカセット：

$AB, AFB, AWB, AYB, AMB, ABC,$
 $AHB, AWHB, AHBC, A_1B,$
 $A_2B, A_{11}B, AB_2, AB_1, AB_{12}, AHB,$
 又は $AHB/AWHB$ の組合わせ物を含有する
 ことを特徴とする請求項 1 に記載の発現ベク
 ター。

14. プラスミドであることを特徴とする請求

21. DNAカセットAを含有しているプラスミドpCFY221N。

22. DNAカセットABを含有しているプラスミドpCFY221N。

23. DNAカセットAF⁻Bを含有している
プラスミドpGFY221N.

24. DNAカセットAHBを含有しているプラスミドpGFY221N。

25. DNAカセットAを含有しているプラスミドpB1052。

26. DNAカセットABを含有しているプラスミドpB1052。

27. DNAカセットAF⁺Bを含有している
プラスミドpB1052。

28. DNAカセットAHBを含有しているプラスミドpB1052.

29. DNAカセットAHBを含有しているプラスミドpUR300。

30. オリゴマー化DNAカセットA₁を含有、
しているプラスミドpUR300。

項8から請求項13のいずれかに記載の発現ベクター

15. プラスミド pGFY221N。

16. プラスミド pB1052.

17. プラスミド pUR300.

18. オリゴマー化及び/又は突然変異している請求項2から請求項6までのいずれかに記載のDNAカセット、又は請求項7に記載のカセット組合わせ物を含有することを特徴とするプラスミドpGFY221N。

19. オリゴマー化及び/又は突然変異している請求項2から請求項6までのいずれかに記載のDNAカセット、又は請求項7に記載のカセット組合わせ物を含有することを特徴とするプラスミドpB1052。

20. オリグマー化及び／又は突然変異している請求項2から請求項6までのいずれかに記載のDNAカセット、又は請求項7に記載のカセット組合わせ物を含有することを特徴とするプラスミドpUR300。

31. 原核生物又は植物を包含する真核生物、及び請求項8から請求項30までのいずれかに記載の形質転換された発現ベクターからなる宿主ベクター系。

32. プラスミド pGFY221N を含有する
大腸菌 CMK603。

33. プラスミド pB1052 を含有する大腸菌 CMK603。

34. 請求項21に記載のプラスミドを含有する大腸菌CMK603。

35. 請求項22に記載のプラスミドを含有する大腸菌CMK603。

36. 請求項23に記載のプラスミドを含有する大腸菌CMK603。

37. 請求項24に記載のプラスミドを含有する大腸菌CMK603。

38. 請求項25に記載のプラスミドを含有する大腸菌CMK603。

39. 請求項26に記載のプラスミドを含有する大腸菌CMK603。

特開昭64-55181 (3)

40. 請求項27に記載のプラスミドを含有する大腸菌CMK603。

41. 請求項28に記載のプラスミドを含有する大腸菌CMK603。

42. プラスミドpGFY221Nを含有する大腸菌DS410。

43. プラスミドpB1052を含有する大腸菌DS410。

44. 請求項21に記載のプラスミドを含有する大腸菌DS410 (DSM3977)。

45. 請求項22に記載のプラスミドを含有する大腸菌DS410。

46. 請求項24に記載のプラスミドを含有する大腸菌DS410。

47. 請求項25に記載のプラスミドを含有する大腸菌DS410。

48. 請求項26に記載のプラスミドを含有する大腸菌DS410。

49. 請求項27に記載のプラスミドを含有する大腸菌DS410 (DSM3976)。

トによってコードされている、13.6モル% Ile、18.2モル% Leu、13.6モル% Val、9.1モル% Lys、13.6モル% Thr、9.1モル% Arg及び9.1モル% His、並びに各々4.5モル%のMet、Trp及びTyr(カセットAF⁻)、又は各々4.5モル%のMet、Phe及びTyr(カセットAW⁻)、又は各々4.5モル%のMet、Phe及びTrp(カセットAY⁻)、又は各々4.5モル%のPhe、Trp及びTyr(カセットAM⁻)のいずれかを含有する請求項54に記載の人工タンパク質。

57. 請求項7に記載のDNAカセットA及びBの組合わせ物(カセットAB)によってコードされている、6.4モル% Ile、8.5モル% Leu、6.4モル% Val、4.3モル% Lys、2.1モル% Met、2.1モル% Phe、6.4モル% Thr、2.1モル% Trp、2.1モル% Tyr、4.3モル% Arg、4.3モル% His、21.3モル% Ala、4.3モル% Asp、2.1モル% Cys、4.3モル% Glu、8.5モル% Gly、6.4モル% Pro及び4.3モル% Serからなる請求項54に記載の人工タ

50. 請求項28に記載のプラスミドを含有する大腸菌DS410 (DSM3975)。

51. プラスミドpUR300を含有する大腸菌BMN71-18。

52. 請求項29に記載のプラスミドを含有する大腸菌BMN71-18。

53. 請求項30に記載のプラスミドを含有する大腸菌BMN71-18 (DSM3974)。

54. 請求項1から請求項6までのいずれかに記載のDNAカセット、又は請求項7に記載のカセット組合わせ物によってコードされている人工タンパク質。

55. 請求項2に記載のDNAカセットによってコードされている、13.0モル% Ile、17.4モル% Leu、13.0モル% Val、8.7モル% Lys、4.3モル% Met、13.0モル% Thr、4.3モル% Trp、4.3モル% Tyr、8.7モル% Arg及び8.7モル% Hisからなる請求項54に記載の人工タンパク質。

56. 請求項6に記載の突然変異DNAカセッ

ンパク質。

58. 突然変異DNAカセットAとDNAカセットBとの組合わせ物である請求項7に記載の組合わせ物によってコードされている、6.5モル% Ile、8.7モル% Leu、6.5モル% Val、4.3モル% Lys、6.5モル% Thr、4.3モル% Arg及び4.3モル% His、並びに各々2.2モル%のMet、Trp及びTyr(カセット組合わせ物AF⁻B)、又は各々2.2モル%のMet、Phe及びTyr(カセット組合わせ物AW⁻B)、又は各々2.2モル%のMet、Phe及びTrp(カセット組合わせ物AY⁻B)、又は各々2.2モル%のPhe、Trp及びTyr(カセット組合わせ物AM⁻B)のいずれかを含有する請求項54に記載の人工タンパク質。

59. DNAカセットAと突然変異DNAカセットBとの組合わせ物である請求項7に記載のカセットABC⁻によってコードされている、6.5モル% Ile、8.7モル% Leu、6.5モル% Val、4.3モル% Lys、2.2モル% Met、2.2モル% Phe、6.5モル% Thr、2.2モル% Trp、2.2

特開昭64-55181(4)

モル% Tyr、4.3モル% Arg、4.3モル% His、21.7モル% Ala、4.3モル% Asp、4.3モル% Glu、8.7モル% Gly、6.5モル% Pro及び4.3モル% Serからなる請求項54に記載の人工タンパク質。

60. 請求項7に記載のDNAカセットA、B及びHの組合わせ物によってコードされている、11.3モル% Ile、14.5モル% Leu、14.5モル% Val、3.2モル% Lys、1.6モル% Met、1.6モル% Phe、4.8モル% Thr、1.6モル% Trp、1.6モル% Tyr、3.2モル% Arg、3.2モル% His、16.1モル% Ala、3.2モル% Asp、1.6モル% Cys、3.2モル% Glu、6.5モル% Gly、4.8モル% Pro及び3.2モル% Serからなる請求項57に記載の人工タンパク質。

61. 突然変異DNAカセットAとDNAカセットB及びHとの組合わせ物である請求項7に記載のカセット組合わせ物A^WH^Bによってコードされている、11.5モル% Ile、14.8モル%

によってコードされている人工タンパク質であって、請求項58に記載のアミノ酸組成を有し、分子量20961.3Dである請求項54に記載の人工タンパク質。

64. オリゴマー化DNAカセットA (m=それぞれ2、6又は12)とDNAカセットBとの組合わせ物である請求項7に記載の組合わせ物によってコードされている人工タンパク質であって、それぞれ、8.6モル% Ile、11.4モル% Leu、8.6モル% Val、5.8モル% Lys、2.8モル% Met、2.8モル% Phe、8.6モル% Thr、2.8モル% Trp、2.8モル% Tyr、5.8モル% Arg、5.8モル% His、14.3モル% Ala、2.9モル% Asp、1.4モル% Cys、2.9モル% Glu、5.7モル% Gly、4.3モル% Pro及び2.9モル% Ser(カセットA、B)、又は11.1モル% Ile、14.8モル% Leu、11.1モル% Val、7.5モル% Lys、3.7モル% Met、3.7モル% Phe、11.1モル% Thr、3.7モル% Trp、3.7モル% Tyr、7.5モル% Arg、7.5モル%

Leu、14.8モル% Val、3.3モル% Lys、1.6モル% Met、1.6モル% Phe、4.9モル% Thr、1.6モル% Tyr、3.3モル% Arg、3.3モル% His、16.4モル% Ala、3.3モル% Asp、1.6モル% Cys、3.3モル% Glu、6.6モル% Gly、4.9モル% Pro及び3.3モル% Serからなる請求項54に記載の人工タンパク質。

62. DNAカセットA及びHと突然変異DNAカセットBとの組合わせ物である請求項7に記載のカセット組合わせ物A^HB^Cによってコードされている、11.5モル% Ile、14.8モル% Leu、14.8モル% Val、3.3モル% Lys、1.6モル% Met、1.6モル% Phe、4.9モル% Thr、1.6モル% Trp、1.6モル% Tyr、3.3モル% Arg、3.3モル% His、16.4モル% Ala、3.3モル% Asp、3.3モル% Glu、6.6モル% Gly、4.9モル% Pro及び3.3モル% Serからなる請求項54に記載の人工タンパク質。

63. オリゴマー化DNAカセットA (m=6)

% His、6.2モル% Ala、1.2モル% Asp、0.6モル% Cys、1.2モル% Glu、2.5モル% Gly、1.9モル% Pro及び1.2モル% Ser(カセットA、B)、又は12.0モル% Ile、16.0モル% Leu、12.0モル% Val、8.1モル% Lys、3.9モル% Met、3.9モル% Phe、12.0モル% Thr、3.9モル% Trp、3.9モル% Tyr、8.1モル% Arg、8.1モル% His、3.3モル% Ala、3.7モル% Asp、0.3モル% Cys、0.7モル% Glu、1.3モル% Gly、1.0モル% Pro及び0.7モル% Ser(カセットA、B)を含有している請求項54に記載の人工タンパク質。

65. DNAカセットAとオリゴマー化DNAカセットB (m=それぞれ2、6又は12)との組合わせ物である請求項7に記載の組合わせ物によってコードされている人工タンパク質であって、それぞれ、4.2モル% Ile、5.6モル% Leu、4.2モル% Val、2.8モル% Lys、1.4モル% Met、1.4モル% Phe、4.2モル% Thr、1.4モル% Trp、1.4モル% Tyr、2.8モル% A

特開昭64-55181 (5)

rg、2.8モル% His、2.8.1モル% Ala、5.7モル% Asp、2.8モル% Cys、5.7モル% Glu、11.2モル% Gly、8.5モル% Pro 及び 5.7モル% Ser(カセットA B₂)、又は1.8モル% Ile、2.4モル% Leu、1.8モル% Val、1.2モル% Lys、0.6モル% Met、0.6モル% Phe、1.8モル% Thr、0.6モル% Trp、0.6モル% Tyr、1.2モル% Arg、1.2モル% His、35.9モル% Ala、7.2モル% Asp、3.5モル% Cys、7.2モル% Glu、14.3モル% Gly、10.8モル% Pro及び7.2モル% Ser(カセットA B₂)、又は1.0モル% Ile、1.3モル% Leu、1.0モル% Val、0.7モル% Lys、0.3モル% Met、0.3モル% Phe、1.0モル% Thr、0.3モル% Trp、0.3モル% Tyr、0.7モル% Arg、0.7モル% His、3.8.5モル% Ala、7.8モル% Asp、3.8モル% Cys、7.8モル% Glu、15.4モル% Gly、11.6モル% Pro及び7.8モル% Ser(カセットA B₂)を含む有している請求項54に記載の人工タンパク質。

% Phe、4.9モル% Thr、0.8モル% Trp、1.6モル% Tyr、3.2モル% Arg、3.2モル% His、16.3モル% Ala、3.2モル% Asp、1.6モル% Cys、3.2モル% Glu、6.6モル% Gly、4.9モル% Pro 及び3.2モル% Serを含む有する請求項54に記載の人工タンパク質。

68. 遺伝子工学によってタンパク質を調製する方法であって、特定のアミノ酸組成を有する人工タンパク質をコードしている請求項1に記載の合成DNAカセットを少なくとも1つ、実質的に既知の方法で合成し、それを発現可能なベクターに組込み、そのベクターを適当な宿主で形質転換し、それを適当な条件下で発現させることを特徴とする請求項54から請求項67のいずれかに記載のタンパク質の調製方法。

69. 請求項2から請求項6までのいずれかに記載のDNAカセット又は請求項7に記載のカセット組合せ物を該ベクターに組込むことを特徴とする請求項54に記載のタンパク質を調製するための請求項68に記載の調製方法。

66. DNAカセットA及びHと、オリゴマー化DNAカセットB (m=2) との組合せ物である請求項7に記載のカセット組合せ物A H B₁によってコードされている、8.2モル% Ile、10.5モル% Leu、8.2モル% Val、2.3モル% Lys、1.2モル% Met、1.2モル% Phe、3.5モル% Thr、1.2モル% Trp、1.2モル% Tyr、2.3モル% Arg、2.3モル% His、23.3モル% Ala、4.6モル% Asp、2.3モル% Cys、4.6モル% Glu、9.4モル% Gly、6.9モル% Pro及び4.6モル% Serを含む有する請求項54に記載の人工タンパク質。

67. 一方がDNAカセットA、H及びBの組合せ物、他方が突然変異DNAカセットAとDNAカセットB及びHとの組合せ物である請求項7に記載のカセット組合せ物A H B/AW⁻H Bによってコードされている、11.4モル% Ile、14.7モル% Leu、14.7モル% Val、3.2モル% Lys、1.6モル% Met、1.6モル%

70. DNAカセットAを該ベクターに組込むことを特徴とする請求項55に記載のタンパク質を調製するための請求項68に記載の調製方法。

71. 突然変異DNAカセットA即ちA F⁻、A W⁻、A Y⁻又はA M⁻をベクターに組込むことを特徴とする請求項56に記載のタンパク質を調製するための請求項68に記載の調製方法。

72. カセット組合せ物A B、A F⁻B、A W⁻B、A Y⁻B、A M⁻B、A B C⁻、A H B、A W⁻H B、A H B C⁻、A₁B、A₂B、A₁₂B、A B₁、A B₂、A B₁₂、A H B₁又はA H B/A W⁻H Bのいずれかを組込むことを特徴とする請求項57から請求項67までのいずれかに記載のタンパク質を調製するための請求項68に記載の調製方法。

73. 発現可能なベクターとしてプラスミドを使用することを特徴とする請求項68から請求項72のいずれかに記載の調製方法。

74. 該カセット(群)によってコードされているタンパク質を直接発現せしめるプラスミドを使

用することを特徴とする請求項73に記載の調製方法。

75. 外来性タンパク質と該カセット(群)にコードされているタンパク質との融合タンパク質を発現せしめるプラスミドを使用することを特徴とする請求項73に記載の調製方法。

76. 原核生物又は植物を包含する真核生物を、形質転換された発現ベクターに適した宿主として使用する請求項68から請求項75のいずれかに記載の調製方法。

77. 宿主として大腸菌株を使用する請求項76に記載の調製方法。

78. 大腸菌株として大腸菌CMK603、HB101、DS410又はBMH71-18を使用する請求項77に記載の調製方法。

79. 請求項35から請求項43まで、請求項46から請求項53まで、請求項55又は請求項56のいずれかに記載の宿主/ベクター系を利用する請求項67に記載の調製方法。

80. DNA配列の逐一的なオリゴマー化の方

E) 二倍になった外来性DNAを有するクローンを単離し、

F) 要すれば、所望の回数だけ工程A) から工程C) を繰り返すことを特徴とする方法。

81. DNA配列の逐一的なオリゴマー化の方法であって、

A) プラスミドに組込まれている、オリゴマー化するつもりの外来性DNAの3'又は5'末端(a又はb)の片方を切断し(第7図の工程1); 開いた外来性DNAの両末端に、制限認識部位を回復する能力はないが開いていない方の外来性DNAの粘着末端の特異性を確立するアダプター分子(第6図)をライゲートし、; 他方の5'又は3'末端(b又はa)に於いて外来性DNAを切断し(第7図の工程3a)、存在する5'-OH末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、

B) 対応する制限酵素(a又はbいずれかに特異性を有している制限酵素)の存在下にプラスミ

法であって、

A) プラスミドに組込まれている、オリゴマー化するつもりの外来性DNAの3'又は5'末端(a又はb)の片方を切断し(第7図の工程1); 開いた外来性DNAの両末端に、制限認識部位を回復する能力はないが開いていない方の外来性DNAの粘着末端の特異性を確立するアダプター分子(第6図)をライゲートし、;

他方の5'又は3'末端(b又はa)に於いて外来性DNAを切断し(第7図の工程3a)、存在する5'-OH末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、

B) 試料の一部を用い、プラスミドに組込まれている該オリゴマー化するつもりの外来性DNAの反対側を切断し(第7図の工程3b)、それをアルカリホスファターゼで処理することで脱リン酸化し、 C) 工程A) 及び工程B) で得られた2つの残基を結合させ、これらをDNAリガーゼによってライゲートし(第7図の工程4)、

D) クローニングを行い、

Dから放出又は単離された外来性DNAを、T4ポリヌクレオチドリガーゼによってライゲートし、要すれば工程A) 及びB) を繰り返す、

C) このようにして得られたオリゴマーを適当なプラスミドに組込み、次いで適当な大腸菌株に形質転換した後、オリゴマー化した外来性DNAをクローニングする

ことを特徴とする方法。

3. 発明の詳細な説明

脂質及び炭水化物に加えてタンパク質は、重要な食物の構成要素である。タンパク質は、胃腸管で酵素による加水分解を受けてアミノ酸群になるが、これらの物質によってタンパク質の生合成に必要な成分が提供される。栄養生理学的見地から言えば、これらは以下のように分類される:

必須アミノ酸:

バリン(Val、V)、ロイシン(Leu、L)、イソロイシン(Ile、I)、フェニルアラニン(Phe、F)、トリプトファン(Trp、W)、メチオニン(Met、M)、スレオニン(Th

r、T)、ロイシン (Lys、K)

準必須アミノ酸:

ヒスチジン (His、H)、アルギニン (Arg、R)、及び

非必須アミノ酸:

グリシン (Gly、G)、アラニン (Ala、A)、プロリン (Pro、P)、セリン (Ser、S)、システイン (Cys、C)、チロシン (Tyr、Y)、アスパラギン (Asn、N)、グルタミン (Gln、Q)、アスパラギン酸 (Asp、D)、グルタミン酸 (Glu、E)。

上記括弧内には、以下の説明の中で使用する通常用いられている3文字記号及び単一文字記号を付記している。

タンパク質の生物価 (栄養性タンパク質100gに於いて形成されるボディー・プロテイン (body protein) のグラム数) は、必須アミノ酸の絶対的含有量のみならず、必須アミノ酸相互及び非必須アミノ酸に対する必須アミノ酸の含有率から測定される [ベリッツ (E.-D. Belitz)、グロシュ (Gr

WHO [FAO-栄養学会報告書番号第37、WHO技術報告書番号第301、ローマ、1966] によって規定されている。高い生物価を有するタンパク質 (アミノ酸を、内生タンパク質を合成するために必要な量で生物に提供するであろうタンパク質) は、生物自身で排除しなければならないある種のアミノ酸の余剰、又は内生タンパク質の生合成の障害を招く欠乏のような不均衡が起きないため、薬物動態学的な目的に相応するものと理解されてきた [エクカート (F. Eckart)、ヘウケンカンブ (P.-U. Heuckenkamp) 及びグァインハイマー (B. Weinheimer) 「Grundlagen und neue Aspekte der parenteralen und Sondenernährung」、ティエメ (Thieme) 出版によるINAシリーズ、1978、243、259頁など参照]。従って、この種類のタンパク質は、高い生理学的な価値 (physiological value) を有し、特に病院内食事療法に対して有用であろう [ウェルシュ (A. Welsch)、クランケナーネールン (Frankenernährung)、チエメ出版 (Thieme Verlag)、1982]。必須アミノ

酸)、レーバッハ (Lehrbuch)、食物化学 (レベンスミッテルケミエ (Lebensmittelchemie))、スプリング出版 (スプリング-ベルラ格 (Springer Verlag))、1982]。一般に、生物価は以下に記載の事項により限定を受ける:

リジン: 穀物タンパク質及び他の植物性タンパク質の欠乏

メチオニン: 牛乳及び肉タンパク質の欠乏

スレオニン: 小麦及びライ麦の欠乏

トリプトファン: カゼイン、とうもろこし及び米の欠乏。

天然のタンパク質には、最善の生物価を有するものはない。卵タンパク質35%及びジャガイモタンパク質65%の混合物が、この最善の生物価に最も近い生物価を有している [「ジャガイモ胚珠の典型モデル (Kartoffel-Ei Murre)」、コフフラニ (E. Kofranyi) 及びジェカット (E. Jekatt)、ホッペーセラー (Hoppe-Seyler's) のZ. physiol. Chem. 335、174]。参考タンパク質 (reference protein) に於ける最善の組成物が、FAO/

酸及び準必須アミノ酸を含有しているようなタンパク質は、動物及びヒトの栄養摂取に対して天然タンパク質の生物価を高めるために非常に意義のあるものである。

肝機能不全 (例えば、肝炎、肝硬変) のようなある種の臨床像では、アミノ酸代謝に障害を受けている。これらは、正常な状態と比較して血漿中の芳香族アミノ酸 Phe、Tyr、Trp 及び Met の量が高く、他方、分枝鎖アミノ酸 Leu、Val 及び Ile の量が少ない [ボーデ (F. Ch. Bode) (1978)、「内科医 (Internist)」、19、72; ホールム (E. Holm)、「Behandlungen mit Aminosäuren bei hepatischer Enzephalopathie」、フュッシャー (Fischer) 出版、1976; エックカート (J. Eckart)、ヘウケンカンブ (P.-U. Heuckenkamp) 及びグァインハイマー (B. Weinheimer) (1978)、チエメ出版 285頁など参照]。この場合、正しいアミノ酸組成物であることが特に重要である。正常な状態に於いて最善であるアミノ酸組成物は、肝性脳障害の増加を伴って疾患を悪化させる。しか

しながら、患者が必要とするのに適合したアミノ酸組成物を使用すれば、肝機能不全を効果的に治療することができる。これらの特別の状態下で最善である上記のようなアミノ酸組成を有するタンパク質は、天然には見いだされていない。

疾患が、食糧中のタンパク質のアミノ酸組成物によって決定的な影響を受ける他の例は、遺伝的な代謝性欠損、フェニルケトン尿症の結果としての虚弱型である〔ヴェンデット(G. G. Wendt)、「Vererbung und Erbkrankheiten」、1974、ヘルデル(Herder) & ヘルデル；ステンゲル(H. Stengel) :「Hunangenetik」(1975)、クエルレ(Quelle) & メイヤー(Meyer)〕。この遺伝的欠損は、フェニルアラニン不含の食事療法によって好適に処置することができるが、これは誕生時から投与しなければならない。必須アミノ酸をすべて含有するがフェニルアラニンは含まないタンパク質は、天然では知られていない。

FAO/WHOの参照タンパク質又は「ジャガイモ胚珠のモデル」に対応するアミノ酸組成物、

はタンパク質の形態で存在しているならば、記述してきた不利益の殆どは存在し得なくなるであろう。説明を加えると、ペプチドは遊離アミノ酸よりも腸管に好適に吸着される〔アディビ(S. A. Adibi)及びキム(Y. S. Kim)、「ペプチドの吸着及び加水分解(Peptide Absorption and Hydrolysis)」(1981)、消化器官の生理学(Physiology of the Gastrointestinal Tract)」、レオナルド・アール・ジョンソン(Leonard R. Johnson)編集、ラビン(Raven)出版〕。

2) 化学的なペプチド合成

この方法は、高価過ぎて経済的に許容されていない。

3) 天然タンパク質の酵素的変換

この方法の場合、タンパク質の天然アミノ酸組成の比率を、酵素的加水分解及び酵素的ペプチド合成の結合作用によって変換させることができる。プラスチン反応を強調する必要がある〔ベリッツ(H. D. Belitz)、グロッシュ(H. Grosch)(1982)、「Lehrbuch der Lebensmittelchemie」65頁な

並びに肝機能不全及びフェニルケトン尿症の治療のためのアミノ酸組成物を得るために、従来は以下の方法がとられている：

1) アミノ酸混合物群の使用

これらの混合物は、前述の3つの使用分野のすべてに使用できる。非常に不都合な点があるので下記に示す：

- ・各アミノ酸に起因する全体としては異なる溶解性。問題となるのは、特にシステイン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシン及びフェニルアラニンの低溶解性である。
- ・苦味。
- ・熱に対する感受性(例えば滅菌操作時)。分解によって部分的に毒性物質を産し、更に生物価の低下を招く。
- ・経口投与に対する問題。
- ・高い浸透性が、生物にとって許容できる量を極めて減退させる。

最善のアミノ酸組成物がそれぞれ、ペプチド又

ど参照〕。幾つかの必須アミノ酸の比率は、どれも増加させ〔アソ(K. Aso)(1974)らの「ゼイン由来のトリプトファン、スレオニン、及びリジン—豊富なプラスチン類」、アグリック・バイオ・ケム(Agric. Biol. Chem.)、38、679〕、フェニルケトン尿症患者に於けるフェニルアラニンの量は減少させた〔ヤマシタ(M. Yamashita)(1978)らの「食事療法食品としての低フェニルアラニン、高チロシンプラスチン」、J. Food Science 41、1029〕。この方法の欠陥は、非常に高い費用がかかることと、実際には再現性が困難な特定できない調製物が形成されることである。

本発明の目的は、簡単な方法で高い再現性を有し、個々の利用分野毎に正確に特定されるアミノ酸組成を有した分子均一のタンパク質を提供することにある。

この目的を解決するために、遺伝子工学を利用する。

従来からの遺伝子工学によれば、遺伝子合成の方法によって、タンパク質遺伝子は遺伝子コード

から合成され、この特定されたコード化アミノ酸配列によって所望のタンパク質を得ることができる。

このことは、例えばソマトスタチン・ペプチド(イタクラ(I. Itakura)(1977)らのサイエンス(Science)198、1056)の場合、及び2つのアミノ酸の反復単位(Asp-Phe)_nをコードしている人工遺伝子[ドーエル(M. T. Doel)(1980)らの「ヌクレック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Res.)」1、8、4575及びD E-A-3102721]に関して成し遂げられた。この最後に言及した方法により、*n*が150までのポリペプチドの混合物が得られる。これは、2つのドデカヌクレオチドをポリメリゼーション(polymerization)し、次いで得られたオリゴマーの混合体をプラスミドへ組込み、更に大腸菌(E. coli)細胞に形質転換して発現させることによって行われた。バイオテクノロジー(Biotechnology)、602頁などの中に、グプタ(S. C. Gupta)らは、ドデカヌクレオチドがアミノ酸(Phe-Trp-

Pro-Lys)の反復単位を含有している場合の、その自己相補性ドデカヌクレオチドによって専ら同じ態様でポリペプチドを調製する試みを報告している。この場合も、この方法によっては非-均一の長さの調製物しか得られないであろう。この著者らは、12-merをポリメリゼーションして約1,000塩基対の二重鎖とすることができた。しかし、おそらくはパリンδροーム配列の非天然の高度な反復により、プラスミドへ組込んでクロニングしても、テトラペプチドをコードしているDNA配列は、120塩基対までしか発見できなかった。この著者らは、テトラペプチド又はそのオリゴマーが実際に大腸菌細胞から産生されることを証明、即ち教示することができなかった。

現在の技術的思想を助成しても、人工タンパク質即ち進化によっては最適化されないタンパク質をコードしている遺伝子の発現は、いずれの方法でも成功を治めることができない[ブルント(F. V. van Brunt)(1986)、バイオテクノロジー、277]。

しかしながら、以下により詳細に説明するが、

本発明に係る方法によって、初めて例えば下記に示すものをコードしている特定されたタンパク質が入手できるようになった：

- 1) 必須アミノ酸のみ(p-A=タンパク質A)。
- 2) フェニルアラニン不含のタンパク質であって、その他の点では最善のアミノ酸組成を有するフェニルケトン尿症の治療のためのタンパク質(p-AF⁻B)、及び
- 3) 分枝鎖アミノ酸を高い比率で含んでいる、肝機能不全の治療のための最善のアミノ酸組成を有するタンパク質(p-AHB)。

このようなタンパク質は天然では知られておらず、更に経済的に許容できる型の考えられる他の方法のいずれによっても調製することができなかった。従って、これらは絶対的に新規なタンパク質を構成するものである。

各種の産業分野で利用できる本発明に係る人工タンパク質は、遺伝子工学によって得られる。適当にコードされたアミノ酸配列を、遺伝子コードを用いてDNA配列に翻訳した[アルベルツ(B. A.

liberta)らのモレキュラー・バイオロジー・オブ・ザ・セル(Molecular Biology of the Cell)、ガーランド(Garland)出版社]。DNAのクロニングレベルに於ける順応性を得るため、及びモジュール則に従って異なるタンパク質を調製できるようにするため、交換可能なDNAカセットに、アミノ酸の特定の種をコードさせる方法を選び出した。

アミノ酸の特定の種からなるタンパク質だけをコードしているDNAカセットに関する考え方は、カセットの突然変異誘発及びオリゴマー化(オリゴメリゼーション)の反応により多数の可能な組合せを与える(以下参照)。

以下に、各種のカセットの型又はその組合せ物に関して本発明を更に詳細に説明する。

カセットAには、必須アミノ酸のみをコードさせ、カセットBには、非必須アミノ酸のみをコードさせ、カセットHには、分枝鎖アミノ酸のみをコードさせる。更に、例えばカセットAF⁻は、フェニルアラニン以外のすべての必須アミノ酸を

等モル百分率の分配性で含有するよう設計したものである。これらのカセットを組合わせることによって、以下のタンパク質をコードしている構造遺伝子が入手できるようになった：

- 1) 必須アミノ酸のみを含有しているタンパク質 (p-A)
- 2) 最善の栄養生理学的分配性ですべてのアミノ酸を含有しているタンパク質 (p-AB)
- 3) フェニルアラニン以外のすべてのアミノ酸を最善の栄養生理学的分配性で存在しているため、フェニルケトン尿症 (PKU) の治療に適したタンパク質 (p-AF⁻B)、及び
- 4) 3つの分枝鎖アミノ酸 Val、Leu、Ile を高い比率で有し、肝機能不全の治療に適したタンパク質 (p-AHB)。これら4つのタンパク質の組成を第1表に示す。

厳密に言えば、アミノ酸チロシンは、ヒトに於いて必須であるアミノ酸に属さない。実用性の点から、このアミノ酸をA-カセットの5'末端に組込んだ。Tyrをコードしている暗号文字 (co

deword) を特異的に除去することは、カセットの突然変異誘発によって容易に行うことができるが、これに関しては、AF⁻カセットを例に挙げて後述する。

(以下余白)

第1表

人工タンパク質 p-A、p-AB、p-AF⁻B
及び p-AHB の、1分子当たりのアミノ酸残
基として特定されているアミノ酸組成

	p-A	p-AB	p-AF ⁻ B	p-AHB
イソロイシン	3	3	3	7
ロイシン	4	4	4	9
バリン	3	3	3	9
リジン	2	2	2	2
メチオニン	1	1	1	1
フェニルアラニン	1	1	—	1
スレオニン	3	3	3	3
トリプトファン	1	1	1	1
チロシン	1	1	1	1
アルギニン	2	2	2	2
ヒスチジン	2	2	2	2
アラニン	—	10	10	10
アスパラギン酸	—	2	2	2
システイン	—	1	1	1
グルタミン酸	—	2	2	2
グリシン	—	4	4	4
プロリン	—	3	3	3
セリン	—	2	2	2

最善の栄養生理学的アミノ酸組成は、FAO/WHOの参照タンパク質、「ジャガイモ胚珠モデル」及び市販されている各種のアミノ酸溶液（例えば、アルブマシド (Albumacid) XP、アポンチ (A ponti) PKU、ミルバ (Milupa) PKU、ファルカミン (Falkamin) 及びブラウン (Braun) APL) に基づいて決定した。アスパラギン及びグルタミンは対象から除外したが、その理由はこれらが必須アミノ酸でなく、また生物により Asp 又は Glu のいずれかから産生され得ること、更に、これらの比率が高過ぎれば、ある条件下では代謝に於ける問題が引き起こされ得ることである。

個々のDNAカセットは、「充填 (filling-in)」法に従って、クレノウ酵素 (Klenow enzyme) を使用し、一重鎖DNAフラグメントに於ける12塩基対の重複した長さを基礎として調製した [ロッシ (F. F. Rossi) ら、1982、J. Biol. Chem. 257, 9225]。この一重鎖DNAフラグメントは、 β -シアノエチル・ホスホロアミダイト法 (β -cyanoethyl phosphoramidite method) [ケスター (H. Köster)

ter)ら、1984、ヌクレイック・アシッド・リサーチ 12、4539]に従い化学合成によって調製した。個々のカセットが遺伝子コードの読取グリッド(reading grid)(読取枠)を保持したままで、特定の態様によって相互に組合わせ得るような方法で、制限部位又は認識部位を位置調節した。例えばフェニルアラニンをコードしている暗号文字(code word)はA-カセットの5'末端に位置させ、その結果、p-A及びp-AF⁻をコードしている遺伝子の合成物を一緒に組合わせることを可能にした(同じ事をTrp、Tyrの暗号文字に適用する)。

A、B及びHカセットの3つのセグメントを第1図に示す。図中、大文字は化学合成によって組込まれた成分を表し、小文字は酵素合成によって組込まれた成分(ヌクレオチド)を表す。コードされたアミノ酸配列をDNAの二重鎖(bp=塩基対)の上に1文字の暗号で示す。対応する制限エンドヌクレアーゼ認識配列を、通常の略語を用いてハイフン中に示す。p-AF⁻をコードして

いるセグメントは、二重鎖の5'末端にあるフェニルアラニン(F)が欠如している点でA-セグメントと異なっている。A、B及びHカセットの酵素による合成を第2図に示す。この第2図に示した大腸菌ポリメラーゼIのクレンウ酵素を使用した二重鎖フラグメントA、B及びHの「イン・ビトロ」合成の実験結果について以下説明する：

a) 完全に発達した二重鎖セグメントの形成事

トレース1：オリゴマーA-1(49-mer)、
トレース2：オリゴマーA-2(46-mer)、
トレース3：標準品ホモオリゴ-dT溶液、
トレース4：酵素添加前の反応混合物、トレース5、6、7、8及び9：酵素添加して1.5、2.5、5、15及び30分後の反応混合物

b) セグメントBの酵素的合成

トレース1：オリゴマーB-2(52-mer)、
トレース2：オリゴマーB-1(53-mer)、
トレース3：反応(25℃)開始45分後の反応混合物

c) セグメントHの酵素的合成

トレース1：酵素反応前のオリゴマーH1及びH2(38-aers)の混合物、トレース2：反応(25℃)30分後の反応混合物

(a)は7M尿素、(b)は8%アクリルアミドゲル及び(c)は5%アクリルアミドに於けるポリアクリルアミドゲル電気泳動。

発現可能なベクターを得るために、どのようにして合成DNAカセットを精製し、再調製するかを、以下に説明する。このためには、個々のカセット又はカセットの組合わせ物を既知のプラスミドに組込み、次いで本発明に係る使用プラスミドのなかの一つに組込むに適した「精製された形態」に再び切断する。

本発明に係るクローニング法は、第3図として表すことができる。

プラスミドpKK233-2【アマン(E. Aam)及びブロシウス(J. Brosius)(1985)、「ジーン(Gene)」40、183】を酵素NcoI及びHindIIIを用いて2回分解し、T4ポリヌクレオチドリガーゼによって、適当に酵素処理したカセットAの組

込みを許容し、プラスミドpKK-A(又はカセットAF⁻を使用した場合はpKK-AF⁻)を得た。次いで、カセットBを第3図に示した方法によって逐一的に(step by step)組ませた。これにより、タンパク質p-A、p-AB及びp-AF⁻Bをコードしている構造遺伝子が利用できるようになった。カセットHをプラスミドpKK-A Bに組込むことによって、タンパク質p-AHBをコードしている構造遺伝子を得た。第4図に、AHB構造遺伝子の組込み領域であるプラスミドpKK-AHBの配列の切断部分(カットアウト)を示す。tacプロモーターの-35及び-10領域、及びシャイン・デルガルの配列(SD-リーボゾーム結合部位)、並びにrrnB遺伝子の部分体も示している。プラスミドpKK-A、pKK-A B、pKK-AF⁻B及びpKK-AHBを大腸菌GM33(dan^r)又はHB101の各々に適用し、合成カセットをクローニングした。DNA配列の正確な組込み及びその精度を、マキナム及びギルバートの配列決定法に従い測定した【マ

キサム及びギルバート(A. M. Maxam and W. Gilbert) (1980)、メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzym.) 65、444]。

カセットという概念は、第3図に示したような方法を実施せしめるばかりでなく、要すれば、適当なリンカー配列が若干付加されたオリゴマー化及び組合わされた個々のカセットをも許容するものである。これにより、所望の調製物の分子量を増加させることができ、「遺伝子の量効果(gene dosage effect)」により、細菌細胞毎に産生される調製物の量が増加する。これに加うるに、短い外来性タンパク質は微生物に於いて不安定でありがちである。更に、個々のオリゴマー化カセットと他のカセットとを組合わせること(オリゴマー化の前及び後)は、選択する必要のあるコード化タンパク質である他のアミノ酸組成を許容するものである。下記にオリゴマー化及び突然変異誘発(以下に説明する)のカセットに関する幾つかの例を挙げる：

p-A₁B, p-A₂B, p-A₃B, p-A₄B

る5'-OH末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、

B) プラスミドに組込まれている、オリゴマー化するつもり外来性DNAの反対側に於ける部分を切断し(第7図の工程3b)、それをアルカリホスファターゼで処理することで脱リン酸化し、

C) 工程A)及び工程B)で得られた2つの残基を結合させ、これらをDNAリガーゼによってライゲートし(第7図の工程4)、

D) クローニングを行い、

E) 二重鎖の外来性DNAを有するクローンを単離し、

F) 要すれば、所望の回数だけ工程A)から工程C)を繰り返す。又は、

A)を行った後、

B) 対応する制限酵素(a又はbいずれかに特異性を有している制限酵素)の存在下にプラスミドから放出又は単離された外来性DNAを、T4ポリヌクレオチドリガーゼによってライゲートし、要すれば工程A)及びB)を繰り返す、

p-A₁B₁, p-A₂B₁, p-A₃B₁, p-A₄B₁

p-A₁H₁B, p-A₂H₁B, p-A₃H₁B, p-A₄H₁B

p-A₁F⁻H₁B, p-A₂W⁻H₁B, p-A₃H₁B/AW⁻H₁B

p-A₂W⁻H₁B/AH₁BC⁻

p-A₁H₂B, p-A₂H₂B, p-A₃H₂B

タンパク質構造の安定化を伴う分子量の増加例を下記に挙げる：

p-A₁B₂, p-A₂B₂, p-A₃B₂, p-A₄B₂

p-A₁H₂B₂, p-A₂H₂B₂, p-A₃H₂B₂

一般に、DNA配列のオリゴマー化は、以下の工程によって行われる：

A) プラスミドに組込まれている、オリゴマー化するつもり外来性DNAの3'又は5'末端(a又はb)の片方を切断し(第7図の工程1)：

開いた外来性DNAの両末端に、制限認識部位を回復する能力はないが開いていない方の外来性DNAの粘着末端に於ける特異性を確立するアダプター分子(第6図)をライゲートし、

他方の5'又は3'末端(b又はa)に於いて外来性DNAを切断し(第7図の工程3a)、存在す

C) このようにして得られたオリゴマーを適当なプラスミドに組込み、次いで適当な大腸菌株に形質転換した後、オリゴマー化された外来性DNAをクローニングする。

突然変異を誘発させたカセット及び/又はオリゴマー化させたカセットの使用例を第2表及び第3表に示す。

(以下余白)

第2表

残基	A	AF	AF'	AW	AW'	AB	AF-B	ABC	AF-B	AW-D	AWB	AF'WB	AWBUC
Ile	3	12.0	12.6	13.6	13.6	6.4	6.5	6.5	6.5	6.5	7	11.3	11.3
Leu	4	17.4	18.2	18.2	18.2	8.5	8.7	8.7	8.7	8.7	9	14.5	14.8
Val	3	13.0	13.6	13.6	13.6	6.4	6.5	6.5	6.5	6.5	8	14.5	14.8
Lys	2	8.7	9.1	9.1	9.1	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	2	3.2	3.3
Met	1	4.3	4.5	4.5	4.5	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	1	1.6	1.6
Phe	1	4.3	4.5	4.5	4.5	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	1	1.6	1.6
Thr	3	13.0	13.6	13.6	13.6	6.4	6.5	6.5	6.5	6.5	8	14.5	14.8
Trp	1	4.3	4.5	4.5	4.5	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	1	1.6	1.6
Tyr	1	4.3	4.5	4.5	4.5	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	1	1.6	1.6
Arg	2	8.7	9.1	9.1	9.1	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	2	3.2	3.3
His	2	8.7	9.1	9.1	9.1	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	2	3.2	3.3
Ala	10	23.3	24.1	24.1	24.1	12.0	12.6	12.6	12.6	12.6	10	16.1	16.4
Asp	2	4.3	4.5	4.5	4.5	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	1	1.6	1.6
Cys	1	2.1	2.1	2.1	2.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1	0.8	0.8
Glu	2	4.3	4.5	4.5	4.5	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	1	1.6	1.6
Gly	4	8.5	8.7	8.7	8.7	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	2	3.2	3.3
Pro	3	6.4	6.5	6.5	6.5	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3	4.9	4.9
Ser	2	4.3	4.5	4.5	4.5	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	1	1.6	1.6
Asn	47	100.2	99.7	99.7	99.7	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	47	100.2	99.7

実例 15

第3表

残基	A	AF	AF'	AW	AW'	AB	AF-B	ABC	AF-B	AW-D	AWB	AF'WB	AWBUC
Ile	6	8.6	18	11.1	36	12.0	3	4.2	3	1.8	3	1.0	7
Leu	8	11.4	24	14.8	48	16.0	4	5.6	4	2.4	4	1.3	8
Val	6	8.6	18	11.1	36	12.0	3	4.2	3	1.8	3	1.0	7
Lys	4	5.8	12	7.5	24	8.1	2	2.8	2	1.2	2	0.7	2
Met	2	2.8	6	3.7	12	2.9	1	1.4	1	0.6	1	0.3	1
Phe	2	2.8	6	3.7	12	2.9	1	1.4	1	0.6	1	0.3	1
Thr	6	8.6	18	11.1	36	12.0	3	4.2	3	1.8	3	1.0	7
Trp	2	2.8	6	3.7	12	2.9	1	1.4	1	0.6	1	0.3	1
Tyr	2	2.8	6	3.7	12	2.9	1	1.4	1	0.6	1	0.3	1
Arg	4	5.8	12	7.5	24	8.1	2	2.8	2	1.2	2	0.7	2
His	4	5.8	12	7.5	24	8.1	2	2.8	2	1.2	2	0.7	2
Ala	10	14.3	30	18.2	60	20.0	6	12.0	6	3.0	6	2.3	12
Asp	2	2.8	6	3.7	12	2.9	1	1.4	1	0.6	1	0.3	1
Cys	1	1.4	3	1.8	6	2.4	0.5	0.8	0.5	0.4	0.5	0.2	0.5
Glu	2	2.8	6	3.7	12	2.9	1	1.4	1	0.6	1	0.3	1
Gly	4	5.8	12	7.5	24	8.1	2	2.8	2	1.2	2	0.7	2
Pro	3	4.3	9	5.8	18	6.0	1.5	1.8	1.5	0.9	1.5	0.5	1.5
Ser	2	2.8	6	3.7	12	2.9	1	1.4	1	0.6	1	0.3	1
Asn	47	100.2	99.7	99.7	99.7	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	47	100.2	99.7

実例 15

当然ながら、AF'、AW'カセットなどを含有する他の多くの組合わせさえも可能である。このような組合わせについては明白であるのでこれ以上の説明を要しないであろう。

このことに関し、既述したことが示し得るものは、個々のカセット又はカセットのひとつとめ(b locks)は多くても12回連続(link)させ、また個々のカセットは既述した態様のカセットの突然変異誘発によって、最高でもせいぜい4つの略号文字しか失われないことである。

前述したオリゴマー化の可能性を示す代表的例として、Aカセットを例に挙げてこれを詳細に説明する。

プラスミドpKK-Aに組込まれたAカセットのDNA配列を第5図に示す。

開始コドンATGはNeoI配列内にあり、BclI配列は、終止コドンTGAの直前に位置している。従って、オリゴマー化はこれらの位置の間起こり易いことが理解できるであろう。当然ながら、タンパク質合成の解読グリッドは保たれ

ていなければならない。このことは、第6図に示している対応するアダプター分子によって行うことができる。プラスミドpKK-AをBclIで開かせ、このBclI部位を、2つのアダプター分子(下線を引いている)によってNeoI*部位に変換した(NeoI* ; これはNeoI特異性に対応する相補的な粘着末端を有しているが、ライゲートによっても、NeoI部位が再構築されないものである:CCATGGでなくCCATGC; 従って、BclI部位はBclI*に変換された)。このことにより、2つの可能性が生じる。ひとつは、NeoI/NeoI*フラグメントが酵素NeoIの存在下特定の方法でオリゴマー化できること、他方は、この同じフラグメントが連続的な遺伝子の複製に使用できることである(第7図)。このことはBclI線状化プラスミドpKK-Aを2つのアダプター分子にライゲートすることによって実施することができる。これは明らかに第7図に於ける工程1、工程2及び工程3aを構成するものである。この結果、BclI部位は、NeoI*部位に変換さ

れる(同時に、Bcl I 部位は Bcl I^{*} に変換される)。プラスミド pKK-A に於ける他の部分を Nco I によって線状化する(第7図の工程3b)。次いで、最初のプラスミド(工程3a)の Nco I 部位を Nco I で切断し、得られた反応調製物を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼによる 5'-OH 末端のリン酸化の後、第7図の工程3bの脱リン酸化プラスミドに結合、即ち T4 ポリヌクレオチドリガーゼでライゲートさせる(第7図の工程4)。起こり得る反応の調製物は第7図を参照すれば分かる。左側のプラスミドが、所望の2倍になった A カセットを有しており、これは、大腸菌 GM33 (dan⁻) でのクローニングによって得ることができた。

このダイマーは、モノマーの連結部位に、Bcl I 配列も、Nco I 配列も有していない(第6図)ので、トリマー、ヘキサマーなどを得るために使用することができる。この態様によれば、A₂ カセットは下記のようにして調製される：



4) Nco I による消化

5) T4 ポリヌクレオチドリガーゼを用いたライゲートによる円形ベクター分子 pGFY221N の調製。

第8図は、注目のクローニング領域の回りの配列、及びプラスミド pGFY221N の制限地図を示している。クローニング部位の「上流」は lac プロモーターであり、一方 rrnB ターミネーター T1 及び T2 はその「下流」にある。

DNA カセット A、AB 及び AHB を組込むために、プラスミド pKK-A、pKK-AB 及び pKK-AHB を各々、Nco I 及び Hind III を用いて分解し、アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。ベクター DNA Hind III (これは、DNA カセット上の配列が同定されていない) を分解した。A 及び AB カセットを、Nco I / Hind III で消化したベクター pGFY221N にライゲートし、以後の精製は行わなかった。最初、AHB カセットを、5% ポリアクリルアミドのゲル電気泳動法によって精製し、次いで既述したように p

個々のプラスミド構築物を大腸菌 HB101 又は GM33 にそれぞれクローンした(プラスミドを Bcl I で切断する場合、及びこの目的のために非メチル化 Bcl I 部位を存在させなければならない場合には必要である)。個々のオリゴマー化は、プラスミド DNA を Nco I / Hind III で処理し、得られた分画を長さのマーカール(length markers)と比較することによって調査できた。

タンパク質 p-A、p-AB、p-AF⁻B、p-AHB の発現は、プラスミド pGFY221N 及び pB1052 で行った。pGFY221N は、ベクター pGFY218L [クルマッジ及びギルバート(K. Talmadge and T. Gilbert)(1980)、「ジーン」12、235] から以下の操作によって得た：

- 1) Pst I での消化
- 2) クレノウ酵素による 3' 末端突出部の除去
- 3) リンカー-d (AGCCATGGCT) の、プラスミドの付け根末端(stump ends)へのライゲート

GFY221N に組込んだ。pGFY221N / AB の位置-特異的突然変異誘発によって pGFY221N / AF⁻B を得た。このためには、pGFY221N / AB を Nco I / Kpn I で消化し(第1図参照)、Nco I 及び Kpn I に関する粘着末端を有した 13-mer 及び 5-mer

5' CATGGTTTGGTAC

3' CAAAC

をそれにライゲートし、この結果フェニルアラニンをコードしているコドン除去した。フェニルアラニンをコードしている暗号文字を除去する方法は、「カセット突然変異誘発」の一般的な適用例を表している。同じような方法で、Trp、Tyr、Cys 又は他のアミノ酸をコードしている暗号文字を欠いている同様のカセット類を得ることができる。

従って、本プラスミドには、

pGFY221N / A

pGFY221N / AB

pGFY221N / AF⁻B、及び

pGFY221N/AHBが包含される。

個々のDNAカセットの正確な配列及び粗込みの正確な部位（並びにタンパク質合成の読取グリッドの正確な配列）をマキサムとギルバートのDNA配列決定法に従って確認した。ベクターpGFY221Nによってコードされた粗換えタンパク質は、そのN-終末端に6個のアミノ酸（その4個はベニシリナーゼシグナル配列由来であり、2個はPstI部位のNcoI部位への変換由来である）を付加的に有している。付加的に6個のアミノ酸を含有する融合タンパク質がこのようにして形成される事実から、個々のDNAカセット内にコードされているタンパク質情報を直接的に発現させることを意図して他のベクターを作り出した。

これらは、pGFY221Nベクターから作り出されるpBIO52型の新規なベクターである。

この目的のため、ベクター類pGFY221N/A、pGFY221N/AB、pGFY221N/AF⁻B、及びpGFY221N/AHBを、NcoI/EcoRIで消化し、これにより、β-ラ

クタマーゼ・プロモーター及び過剰の6個のN-終末コドンを含む有している221塩基対の長さのフラグメントを除去した（第8図及び第9図参照）。約4.6ダルトンの大きさのプラスミドフラグメントをそれぞれ1%アガロースゲルで精製し、環化の条件下で大腸菌alpE遺伝子の翻訳開始領域をコードしている化学的に合成された52塩基対の長さのフラグメントを用いたライゲート法によって、T4ポリヌクレオチドリガーゼでライゲートした。

得られた新規なプラスミドpBIO52のコード化領域の配列及び制限地図を第9図に示す。これにより、更に下記に示した新規な発現ベクターが得られた：

pBIO52
pBIO52/A
pBIO52/AB
pBIO52/AF⁻B、及び
pBIO52/AHB。

個々のDNAカセットのDNA配列及び正確な

粗込み部位を、マキサムとギルバートのDNA配列決定法によって確認した。第4表に、pGFY221N及びpBIO52誘導体によってコードされる人工タンパク質の分子量を示す。

第4表

人工タンパク質	pBIO52から 発現されるタン パク質の分子量	pGFY221Nから 発現されるタンパク 質の分子量
p-A	3238.8 D	4048.1 D (1-A)*
p-AB	5784.8 D	6474.6 D (1-AB)*
p-AF ⁻ B	5599.6 D	6309.4 D (1-AF ⁻ B)*
p-AHB	7648.8 D	8358.6 D (1-AHB)*
p-A。	20961.3 D	

*) pGFY221Nに於ける一つのNcoI制限部位の「上流」をコードしている6個のアミノ酸 (Met-Ser-Ile-Gln-Ala-AIa) のリーダー配列。このリーダーペプチドは、融合タンパク質の分子量を各々638.8 Dまで増加させる。

第5表は、各タンパク質のアミノ酸配列をまとめたものである。

アミノ酸組成

第5表

タンパク質

A	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT	PSAASADODAGPGCAEAAGAC	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT	PSAASADODAGPGCAEAAGAC
1-A	MSIQAA	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT	PSAASADODAGPGCAEAAGAC	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT
AF ⁻ B	MSIQAA	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT	PSAASADODAGPGCAEAAGAC	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT
1-AF ⁻ B	MSIQAA	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT	PSAASADODAGPGCAEAAGAC	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT
AB	MSIQAA	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT	PSAASADODAGPGCAEAAGAC	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT
1-AB	MSIQAA	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT	PSAASADODAGPGCAEAAGAC	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT
AHB	MSIQAA	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT	PSAASADODAGPGCAEAAGAC	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT
1-AHB	MSIQAA	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT	PSAASADODAGPGCAEAAGAC	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT
AS	MSIQAA	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT	PSAASADODAGPGCAEAAGAC	MYFVLVIVIVIALTHLTHLIT

第4表及び第5表には、Aカセットのオリゴマー化により得られるヘキサマーA₆のデータも記載している。

更に、発現系として、既知のプラスミドpUR292の誘導体を調製した【リュザー及びミュラー-ヒル(U. Ruther and B. Muller-Hill) (1983)、EMBOジャーナル2、1791】。これにより、融合タンパク質がβ-ガラクトシダーゼの主要部分と人工タンパク質A、AB、AF⁻B、AHB及びA₆との間から得られるが、この場合、人工タンパク質は、安定化させるため及びプロテアーゼから保護するためにβ-ガラクトシダーゼのC-終末端に位置させる。本発明に適當なベクターpUR300を得るために、プラスミドpUR292をBamH I/Hind IIIで消化し、BamH I及びHind IIIの粘着末端を有する二重鎖アダプター形態の化学合成した2つの12-mersをライゲートすることで付加的なNeo^r部位を導入した。クローニング部位にこのDNA配列を有する得られたベクター構築物を第10図に示す。

た。

トレース1: DNAを加えずに(³⁵S)-メチオニンを加えたイン・ビトロ転写-翻訳系
 トレース2: pBIO52、トレース3: pGFY221N、トレース4: pBIO52/A、トレース5: pGFY221N/A、トレース6: pBIO52/AB、トレース7: pGFY221N/AB、トレース8: pBIO52/AF⁻B、トレース9: pGFY221N/AF⁻B、トレース10: pBIO52/AHB、トレース11: pGFY221N/AHB。Mは標準分子量の標品を示す。Bタンパク質はそのC-終末端に唯一つのシステイン成分(第1図参照)しか含有していないことから、Bタンパク質をそのC-終末端に含有する発現されたタンパク質は完全(無傷)であることが確認できる。

第12図は、タンパク質p-AB、p-AF⁻B及びp-AHBがベクターpGFY221N及びpBIO52にて完全な形態で発現されることを示している。以下第12図の実験結果について

イン・ビトロ発現のため、超速心分離によって精製したpGFY221N、pBIO52及びpUR300の型のプラスミドを、³⁵S-メチオニン又は³⁵S-システインのいずれかの存在下、アメルシャン社(company Amersham)から市販されている転写-翻訳系によって発現させ、得られた調製物を15%ポリアクリルアミドゲルの電気泳動法で分析した。第11図は、DNAカセットによりコードされているタンパク質A、AB、AF⁻B及びAHBが、タンパク質の長さに於ける標準品と比較して、pGFY221N及びpBIO52型の個々のプラスミドに於いて正確な大きさで発現されていることを示している。個々のタンパク質バンド(帯)の濃度によっても、人工タンパク質のイン・ビトロ発現効率が極めて高いことが証明されている。以下、第11図に於ける実験結果について説明する:

(³⁵S)-メチオニンでマークしたポリペプチドに於ける電気泳動のオートラジオグラフィー(15%ポリアクリルアミドゲルSDSゲル)を行っ

説明する:

イン・ビトロ転写-翻訳系に於いて、(³⁵S)-メチオニン又は(³⁵S)-システインの存在下に、ベクターpBIO52及びpGFY221Nを使用してポリペプチドを発現させた。

A: トレース1: (³⁵S)-メチオニンマークしたpBIO52、トレース2: (³⁵S)-システインマークしたpBIO52、トレース3: (³⁵S)-メチオニンマークしたpBIO52/A、B、トレース4: (³⁵S)-システインマークしたpBIO52/AB、トレース5: (³⁵S)-メチオニンマークしたpBIO52/AF⁻B、トレース6: (³⁵S)-システインマークしたpBIO52/AF⁻B、トレース7: (³⁵S)-メチオニンマークしたpBIO52/AHB、トレース8: (³⁵S)-システインマークしたpBIO52/AHB。

B: トレース1: (³⁵S)-メチオニンマークしたpGFY221N、トレース2: (³⁵S)-メチオニンマークしたpGFY221N/AB、

トレース3: (35 S) - システインマークした pG F Y 2 2 1 N / A B、トレース4: (35 S) - メチオニンマークした pG F Y 2 2 1 N / A F⁻ B、トレース5: (35 S) - システインマークした pG F Y 2 2 1 N / A F⁻ B。

M: (14 C) - マークした標準分子量の標品。
15% SDS - ポリアクリルアミドゲルの電気泳動に於けるオートラジオグラフィ。

イン・ビボに於ける発現試験を、小型細胞系 (mini cell system) (宿主: 大腸菌 DS 4 10) で行った。第13図は、この実施例としての幾つかの試験結果を示している。以下第13図の実験結果について説明する:

ベクター p B I O 5 2 (A) 及び p G F Y 2 2 1 N (B) を使用し、相応する遺伝子の翻訳調製物の産生をイン・ビトロ及びイン・ビボに於いて比較した。

奇数番号のトレースは、イン・ビトロ転写-翻訳系に係る (35 S) メチオニンマークした調製物であり、偶数番号のトレースは (35 S) メチオニン

マークした後の小型細胞系由来のタンパク質である。

トレース1及び2: p G F Y 2 2 1 N、トレース3及び4: p G F Y 2 2 1 N / A、トレース5及び6: p G F Y 2 2 1 N / A B、トレース7及び8: p G F Y 2 2 1 N / A H B、トレース9及び10: p B I O 5 2、トレース11及び12: p B I O 5 2 / A、トレース13及び14: p B I O 5 2 / A B、トレース15及び16: p B I O 5 2 / A F⁻ B、トレース17及び18: p B I O 5 2 / A H B、M: (14 C) - マークした標準分子量の標品。 (35 S) メチオニンマークしたポリペプチドの電気泳動 (15% SDS - ポリアクリルアミド SDS ゲル) に於けるオートラジオグラフィ。発現効率及び安定性が、個々のベクター及びコードされているタンパク質によって左右されることは明らかである。p - A は、ベクター p G F Y 2 2 1 N を用いて得られ、タンパク質 p - A F⁻ B 及び p - A H B の有意な量はベクター p B I O 5 2 を用いて得られる。

A カセットをベクター p U R 3 0 0 内で発現させた。

ここに、これらのタンパク質を β -ガラクトシダーゼの C-末端領域に融合させる。宿主として、過剰量の lac-レプレッサーを産生する大腸菌株 B M H 7 1 - 1 8 を使用した。IPTG によって、lac-オペロンの発現を個々に誘発させることができる。第14図は、 35 S - メチオニンでマークした後に於ける融合タンパク質のイン・ビトロ発現を表している。

これによれば、相応して長くなったタンパク質が非常に穏やかな反応で発現され、産生されることは明白である。以下第14図の実験結果について説明する:

ベクター p U R 3 0 0、p U R 3 0 0 / A H B 及び p U R 3 0 0 / A を使用して「イン・ビトロ」転写-翻訳系に於けるタンパク質の発現を観察した。

トレース1、2及び3は、(35 S) メチオニンマークしたタンパク質を15% SDS - ポリアクリ

35 S - システインのマーキング (marking) により、大腸菌細胞から産生させたタンパク質 p - A F⁻ B 及び p - A H B、即ち N-末端メチオニン及び C-末端システインを有するタンパク質が完全な形態でイン・ビボでさえも発現されることを調べることができた。第6表は、p B I O 5 2 及び p G F Y 2 2 1 N ベクターに於いて見いだされたタンパク質の安定性を示している。

第6表

タンパク質	小型細胞	タンパク質	小型細胞
	での安定性		での安定性
p - A	-	1 - A	++
p - A B	-	1 - A B	+
p - A H B	++	1 - A H B	+

++ 完全な安定性

+) 部分的な安定性

-) 非安定性

人工タンパク質の発現に於ける他の実施例として、タンパク質 p - A H B 及び p - A に係る D N

ルアミドゲルで分析したものである。

第15図は、大腸菌株BMH71-18に於ける融合タンパク質のイン・ビボ産生を表している。他の大腸菌タンパク質の合成に加えて、所望の融合タンパク質の過剰産生が明らかに観察できる。この合成がIPTGによってのみ誘導され得ることから、これらはlac-オペロン発現の生産物だけであると言える。この融合タンパク質は、常法に従ったアフィニティークロマトグラフィーによって精製することができた。以下第15図について説明する：

ベクターpUR300、pUR300/AHB及びpUR300/A。を使用し、大腸菌BMH71-18に於けるβ-ガラクトシダーゼ(β-gal)、及び融合タンパク質β-gal-AHB及びβ-gal-A。の発現を観察した。

トレース1：分子量の標準品としての精製β-ガラクトシダーゼ(シグマ(Sigma))

トレース2及び3：IPTG誘導していないpUR300及びIPTG誘導後のpUR300

p-AF⁻B、p-A。及びp-AHBに関する実験例を詳細に述べてきた。本明細書に於いては、参考文献を周知の方法によって挙げた。一重鎖DNAフラグメントの化学的合成は、ケスター(Kester)(1984)らのスクレイック・アシッド・リサーチ12、4539に従って行った。DNAの調製、制限試験及びライゲート試験、クレノウ酵素によるDNAの放射活性マーク、アガロース及びポリアクリルアミドゲル、電気泳動法、プラスミドの組み立て、大腸菌細胞の形質転換、イン・ビトロ発現実験、並びに大腸菌小型細胞の使用に関しては、文献に記載の態様又は方法、即ちマニアチス(T. Maniatis)らの「モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)：実験の手引き」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)、ニューヨーク、及びブロシウス(J. Brosius)(1986)、「ベクター：モレキュラー・クローニングベクター及びその用途の要約」(ロドリゲス(R. C. Rodriguez)及びデンハート(D. T. Denhardt)、発表者：バタワ

トレース4及び5：IPTG誘導していないpUR300/AHB及びIPTG誘導後のpUR300/AHB

トレース6及び7：IPTG誘導していないpUR300/A。及びIPTG誘導後のpUR300/A。試料は、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルで分析した。

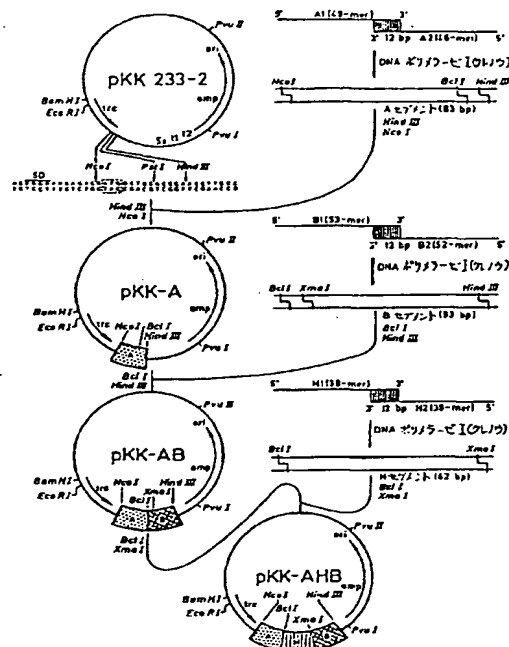
既に詳細に説明してきたプラスミドpGFY21N、pB1052及びpUR300に加えて従来からの他の発現ベクター/宿主系も、カセットA、AF⁻、B及びH、カセット毎に最高で4つの暗号文字が減っているこれらの突然変異誘発調製物であるカセット、それらのオリゴマー化カセット、又はそれらの組合わせ物を組込むのに有用である。個々の有用な発現ベクターは、ホモロジーな原核生物、例えば説明してきた細菌株である大腸菌CMK603、DS410及びBMH71-18、並びに植物を包含する真核生物例えば酵母などに於いて形質転換できる。

上記に於いて、タンパク質p-A、p-AHB、

ス(Butterworth)出版社、ストーンハム(Stoneham)、マサチューセッツ(Mass.)、アメリカ合衆国(U.S.A.))、並びにストックカー(M. C. Stoker)ら(1984)、「転写及び翻訳、実際のアプローチ」(ハンス(B. D. Hannes)及びヒギンズ(S. J. Higgins)、発表者：IRL出版、オックスフォード、イギリス国(U.K.))によって行った。更に、ミラー(J. M. Miller)(1972)「分子遺伝学の実験」コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、ニューヨークも挙げられる。DNAの配列決定は、マキサムとギルバート(A. M. Maxam and W. Gilbert)(1980)、メソッド・エンザイモロジー(Methods Enzymol.)65、499に従って行った。

ブタベスト条約により、ドイツ・サムリング・ホン・ミクロオルガニズメン(Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen)(ジャーマン・コレクション・オブ・ミクロオーガニズム)[グリンスバッハストラッセ8番、D-3400、ゲッティンゲン]に、本発明に使用した下記の宿主ベクター系が寄託されている：

Figure 1 consists of three SDS-PAGE gels labeled a, b, and c. Panel a shows 10 lanes numbered 1 to 10 at the top. On the left, molecular weight markers are indicated at 83, 49, and 46 kDa. The lanes show a complex pattern of protein bands. Panel b shows 3 lanes numbered 3, 2, and 1 at the top. On the right, molecular weight markers are indicated at 93, 43, and 38 kDa. Lane 3 shows a prominent band near 93 kDa, while lanes 2 and 1 show bands near 43 and 38 kDa. Panel c shows 2 lanes numbered 1 and 2 at the top. On the left, molecular weight markers are indicated at 64, 41, and 38 kDa. Lane 1 shows a prominent band near 64 kDa, while lane 2 shows bands near 41 and 38 kDa.



P i r . 3

[illegible]

F i n . 4

Met Val Phe Trp Tyr Leu H₂His⁺ Leu Ile Thr STOP

5'—CCATGCTTTTCGGTACCTG—CTGATCACCCTGAAGCTT—3'

3'—GGTACCAAAAAGACCATGGAC—CACTAGTGGACCTTGAA—5'

—Bcl— —KpnI— —Bcl— —HindIII—

Fig. 5

Ile Leu Arg Met
 5'— TGATCCTGCG 3'
 3'— ACTAGGACGCGTAC—H 5'
 —Bcl^I— —Not^I—

Fig. 5

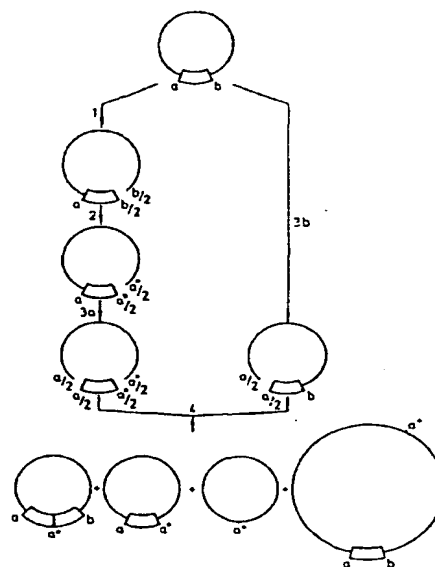


Fig. 7

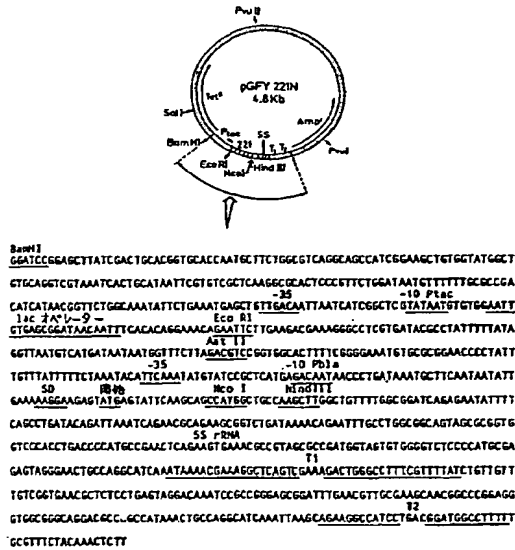


Fig. 8

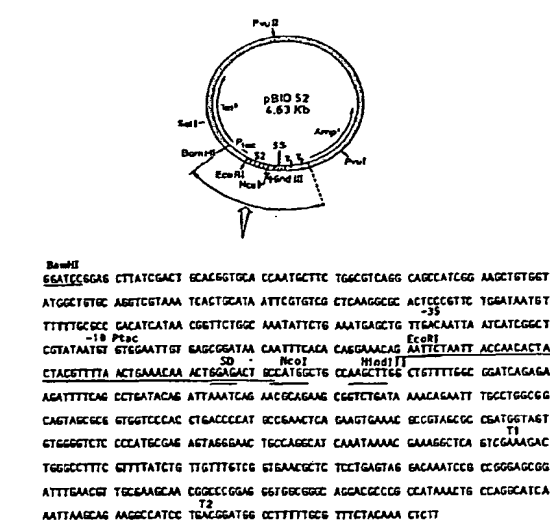


Fig. 9

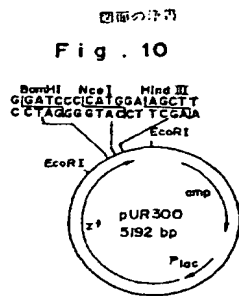


Fig. 10

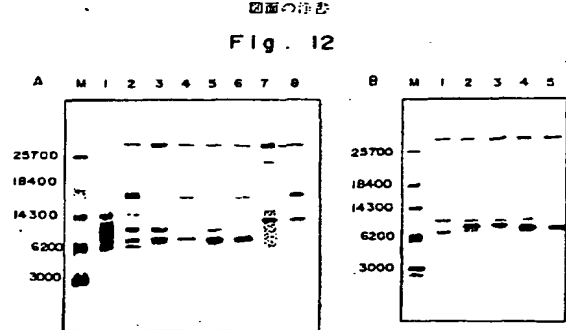
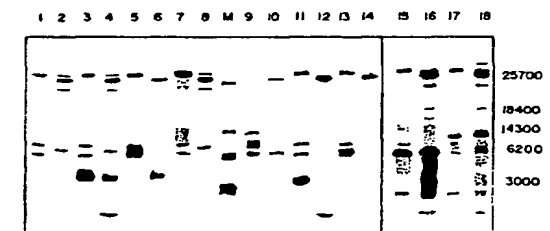
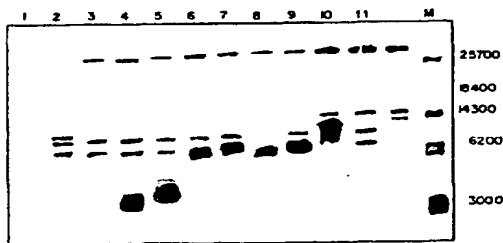


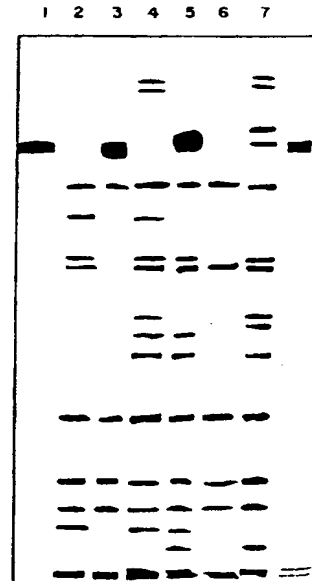
Fig. 11



図面の浄書

Fig. 15 図面の浄書

Fig. 14



第1頁の続き

⑨Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 13/00		8318-4H
C 12 N 1/20		G-8515-4B
C 12 P 21/02		C-6712-4B
//(C 12 N 1/20		
C 12 R 1:19)		
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:19)		
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:91)		
C 07 K 99:00		

⑨発 明 者	ヤセツク・ピアナット	ドイツ連邦共和国2000ハンブルグ11、ツオイクハウスト ラーセ12番
⑨発 明 者	ニツク・ケネディー	ドイツ連邦共和国4000デュッセルドルフ13、ザイデンペー グ54番
⑨発 明 者	ベルント・ホーフアー	ドイツ連邦共和国3340グオルフエンビュツテル、ライプニ ッツストラーセ8番

特開昭64-55181 (23)

手続補正書(方式)

特許庁長官 殿 昭和63年 8月24日
1. 事件の表示 昭和63年特許第 26419号

2. 発明の名称

特定のアミノ酸組成を有する人工クンバク質、並びに
その調製法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 ドイツ連邦共和国デー-2000ハンブルグ50、
ストレセマンストラーセ268-280番

名称 ビオシンテック・バイオケミシュ・シンテセテックニッ
ク・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・
ハフツング

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市東区城見2丁目1番61号
ツイン21 MIDタワー内 電話(06)949-1261

氏名 井理士(6214) 青 山 茂

5. 補正命令の日付: 昭和63年7月26日(発送日)

6. 補正の対象: 図面の第2図、第11図~第15図
および譲渡証書

7. 補正の内容:

(イ) 図面

別紙の通り、適正な用紙を用いて十分に濃厚な黒
色で鮮明に描いた図面、第2図および第11図~
第15図を提出致します。別紙には第10図が入っ
ておりますが、これは単に浄書として提出したに
過ぎず、内容に変更はありません。

(ロ) 譲渡証書

別紙の通り、発明者からの譲渡証書(訳文付き)を
提出致します。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.